

64

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. August 2001 (16.08.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/58477 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 39/00, A61P 35/00 (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, 81825 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/00470

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:

7. Februar 2001 (07.02.2001)

(25) Einreichungssprache:

Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache:

Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

100 06 033.1 10. Februar 2000 (10.02.2000) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder und

Veröffentlicht:

(72) Erfinder: VON KNEBEL DOEBERITZ, Magnus [DE/DE]; Chirurgische Universitätsklinik, Sektion für Molekulare Diagnostik und Therapie, Im Neuenheimer Feld 110, 69120 Heidelberg (DE).

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(72) Erfinder; und

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LINNEBACHER, Michael [DE/DE]; zum Klopp 23, 66578 Stennweiler (DE). RUDY, Wolfgang [DE/DE]: Albert-Einstein-Strasse 76, 75015 Bretten (DE).



(54) Title: IMMUNIZATION OF AN INDIVIDUAL AGAINST CARCINOMA AND THE PRELIMINARY STAGES THEREOF

(54) Bezeichnung: IMMUNISIERUNG EINES INDIVIDUUMS GEGEN CARCINOME UND IHRE VORSTUFEN

WO 01/58477 A2

(57) Abstract: The invention concerns a pharmaceutical preparation comprising a cell cycle regulatory protein and/or an expressible nucleic acid which codes for said protein in an amount suitable for immunization of an individual against carcinoma and the preliminary stages thereof, in addition to conventional auxiliary agents. The invention also concerns the use of a cell cycle regulatory protein and/or an expressible nucleic acid which codes for said protein for the immunization of an individual against carcinoma and the preliminary stages thereof.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein Zellzyklus-Regulatorprotein und/oder eine exprimierbare, hierfür kodierende Nukleinsäure in einer für eine Immunisierung eines Individuums gegen Carcinome und ihre Vorstufen geeigneten Menge sowie übliche Hilfsstoffe, und die Verwendung eines Zellzyklus-Regulatorproteins und/oder einer exprimierbaren hierfür kodierenden Nukleinsäure zur Immunisierung eines Individuums gegen Carcinome und ihre Vorstufen.

**Immunisierung eines Individuums gegen
Carcinome und ihre Vorstufen**

5 Die vorliegende Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zu-
sammensetzung, die ein Zellzyklus-Regulatorprotein enthält,
und die Verwendung der pharmazeutischen Zusammensetzung zur
Immunisierung eines Individuums gegen Carcinome und ihre Vor-
stufen.

10 An Carcinomen erkranken und versterben jährlich mehrere Mil-
lionen Menschen weltweit. Diese Sterblichkeitsraten sind seit
vielen Jahren unverändert trotz intensiver Therapie-Forschun-
gen. Bisher werden die Patienten mit Carcinomen vielfach einer
15 chirurgischen Entfernung der Carcinome bzw. einer Chemo- oder
Strahlentherapie unterzogen. Damit sind aber massivste Neben-
wirkungen verbunden, die dann zu den Sterblichkeitsraten der
Patienten mit Carcinomen beitragen.

20 Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde,
ein Mittel bereitzustellen, mit dem gegen Carcinome therapeu-
tisch und prophylaktisch vorgegangen werden kann, wobei vor-
stehende Nebenwirkungen vermieden werden.

25 Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patent-
ansprüchen erreicht.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des
Anmelders, daß bei Carcinomen bzw. ihren Vorstufen Zellzyklus-
30 Regulatorproteine in veränderter Form oder Menge vorliegen.
Beispielsweise findet sich in Carcinomen eine Überexpression
von Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (vgl. deutsches Pa-

tent 198 29 473 des Anmelders). Ferner hat der Anmelder erkannt, daß Individuen gegen in Form oder Menge veränderte Zellzyklus-Regulatorproteine immunisiert werden können, wodurch gegen Carcinome und ihre Vorstufen therapeutisch und prophylaktisch vorgegangen werden kann. Der Anmelder hat dies in invitro- wie auch in invivo-Experimenten gezeigt (vgl. nachstehendes Beispiel).

Somit betrifft die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein Zellzyklus-Regulatorprotein und/oder eine exprimierbare hierfür kodierende Nukleinsäure in einer für eine Immunisierung eines Individuums gegen Carcinome und ihre Vorstufen geeigneten Menge sowie übliche Hilfsstoffe.

Der verwendete Ausdruck "Zellzyklus-Regulatorprotein" umfaßt Zellzyklus Regulatorproteine jeglicher Art und Herkunft. Beispielsweise können es Zykline sein. Besonders können es Zyklin-abhängige Kinasen, wie cdk4 und cdk6, sein, welche die Zykline regulieren. Ganz besonders können es Zyklin-abhängige Kinase-Inhibitoren sein, welche wiederum die Zyklin-abhängigen Kinasen regulieren. Beispiele der Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitoren sind die Proteine p15, p16, p18, p19, wobei p16 bevorzugt ist. Die Zellzyklus-Regulatorproteine können in Wildtyp- oder veränderter Form vorliegen. Letztere Form umfaßt Veränderungen der Aminosäuresequenz, wie Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von einer oder mehreren Aminosäuren. Auch können Fragmente von Zellzyklus-Regulatorproteinen als solche oder in Verbindung mit Trägern vorliegen, wobei die Fragmente eine Wildtyp- oder eine veränderte Aminosäuresequenz haben können. Günstig ist es, wenn die Träger im Individuum nicht als immunogen wirken. Solche Träger können Individuum-eigene oder -fremde Proteine bzw. Fragmente davon sein. Bevorzugt sind Träger, wie Serumalbumin, Fibrinogen oder Transferrin bzw. ein Fragment davon. Besonders günstig ist es, wenn die Fragmente der Zellzyklus-Regulatorproteine Epitope enthalten, die von cytotoxischen T-Zellen, z.B. CD8⁺ T-Zellen, erkannt werden und eine cytotoxische Immunantwort induzieren können. Solche Epitope von Zellzyklus-Regu-

latorproteinen können durch dem Fachmann bekannte Verfahren, insbesondere durch Verwendung eines Softwaresystems des NIH (NIH bioinformation service http://bimas.dcrt.nih.gov.cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform) ermittelt werden. Von Vorteil kann es ferner sein, wenn unterschiedliche Zellzyklus-Regulatorproteine oder Fragmente davon, für die vorstehenden Ausführungen entsprechend gelten, gleichzeitig vorliegen. Zur Herstellung vorstehender Zellzyklus-Regulatorproteine wird z.B. auf Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989) verwiesen.

Der verwendete Ausdruck "exprimierbare für ein Zellzyklus-Regulatorprotein kodierende Nukleinsäure" umfaßt jegliche Nukleinsäure, z.B. RNA oder DNA, die in einem Individuum exprimierbar ist und für ein Zellzyklus-Regulatorprotein, für das vorstehende Ausführungen entsprechend gelten, kodiert. Die Nukleinsäure kann als solche, d.h. zusammen mit für ihre Expression geeigneten Elementen, oder in Verbindung mit einem Vektor vorliegen. Beispiele solcher Elemente sind Promotoren und Enhancer, wie CMV-, SV40-, RSV-, Metallothionein I und Polyhedrin-Promotor bzw. CMV- und SV40-Enhancer. Weitere für die Expression geeignete Sequenzen gehen aus Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) hervor. Darüberhinaus können als Vektoren jegliche für die Expression in Säugerzellen geeignete Vektoren verwendet werden. Dies sind z.B. pCDNA3, pMSX, pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4 sowie von pcDNAI/amp, pcDNAI/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo und pHg stammende Vektoren. Auch können als Vektoren rekombinante Viren, z.B. Adenovirus, Vaccinia-Virus oder Adeno-assoziiertes Virus, verwendet werden. Hinsichtlich der Herstellung vorstehender Nukleinsäuren, insbesondere von Vektoren, die solche Nukleinsäuren enthalten, wird z.B. auf Sambrook et al., supra, verwiesen.

Der verwendete Ausdruck "Carcinome und ihre Vorstufen" umfaßt Carcinome jeglicher Art und Herkunft bzw. Vorstufen dieser.

Beispielsweise können es Carcinome des oberen Respirationstraktes oder Anogenital-Carcinome, insbesondere das Cervix-Carcinom und seine Vorstufen, wie cervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN I-III), Carcinoma in situ (CIS), etc. sein. Ebenso sind auch benigne Veränderungen wie Papillome, Adenome, Hyperplasien oder ähnliche Proliferationen epithelialer, mesenchymaler oder hämatopoetischer Proliferationen hier zuzuordnen.

10 Der verwendete Ausdruck "Individuum" umfaßt ein Individuum jeglicher Art und Herkunft, das Zellzyklus-Regulatorproteine aufweist und an Carcinomen bzw. ihren Vorstufen erkranken kann. Beispiele eines solchen Individuums sind der Mensch und das Tier sowie Zellen von diesen.

15 Der verwendete Ausdruck "für eine Immunisierung eines Individuums geeignete Menge" umfaßt jegliche Menge eines Zellzyklus-Regulatorproteins, für das vorstehende Ausführungen entsprechend gelten, bzw. einer exprimierbaren hierfür kodierenden Nukleinsäure, für die vorstehende Ausführungen entsprechend gelten, mit der ein Individuum immunisiert werden kann. Die Menge hängt davon ab, ob ein Zellzyklus-Regulatorprotein oder eine exprimierbare hierfür kodierende Nukleinsäure verwendet wird. Auch hängt die Menge davon ab, ob die Immunisierung des Individuums mehr auf eine Induktion von gegen veränderte Zellzyklus-Regulatorproteine gerichteten Antikörpern oder auf eine Stimulierung von gegen veränderte Zellzyklus-Regulatorproteine gerichteten cytotoxischen T-Zellen, z.B. CD8⁺ T-Zellen, abzielt. Beide Möglichkeiten der Immunisierung können durch die vorliegende Erfindung erreicht werden. Des Weiteren hängt die Menge davon ab, ob die Immunisierung als prophylaktische oder therapeutische Behandlung beabsichtigt ist. Darüber hinaus spricht das Alter, das Geschlecht und das Gewicht des Individuums eine Rolle für die Bestimmung der Menge. Günstig ist es, wenn dem Individuum 100 μ g - 1 g eines Zellzyklus-Regulatorproteins bzw. 10⁶ - 10¹² MOI eines rekombinanten, eine exprimierbare für ein Zellzyklus-Regulatorprotein kodierende Nukleinsäure

enthaltenden Virus injiziert werden. Die Injektion kann an mehreren Stellen des Individuums intramuskulär, subkutan, intradermal oder in jeder anderen Applikationsform erfolgen. Ferner kann es günstig sein, ein oder mehrere "Booster-Injektionen" mit ca. gleicher Menge durchzuführen, wobei es besonders günstig sein kann, in den einzelnen Injektionen verschiedene Fragmente der jeweiligen Zellzyklus-Regulatorproteine zu verwenden.

10 Der verwendete Ausdruck "übliche Hilfsstoffe" umfaßt jegliche Hilfsstoffe, die sich für eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Immunisierung eines Individuums eignen. Solche Hilfsstoffe sind z.B. Immunisierungs-Adjuvantien, wie GM-CSF oder Freund's Adjuvans, gepufferte Kochsalzlösungen, Wasser, Emulsionen, wie Öl/Wasser-Emulsionen, Netzmittel, sterile Lösungen, etc.

15

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, Individuen, insbesondere den Menschen und Tiere, gegen veränderte Zellzyklus-Regulatorproteine zu immunisieren. Die 20 Immunisierung erfolgt sowohl durch die Induktion von Antikörpern als auch durch die Stimulierung von CD8⁺-T Zellen, die gegen veränderte Zellzyklus-Regulatorproteine gerichtet sind. Somit ist ein prophylaktisches und therapeutisches Vorgehen gegen Carcinome und ihre Vorstufen möglich.

25 Die Erfindung wird durch das nachfolgende Beispiel erläutert.

Beispiel: Stimulierung von CD8⁺-T Zellen gegen den Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitor p16 und Lyse von p16-überexprimierenden Carcinom-Zellen.

30
(A) Stimulierung von CD8⁺-T Zellen gegen p16.

Von einem gesunden Spender werden periphere mononukleäre 35 Zellen gewonnen und einer sog. ELISPOT-Analyse unterzogen. Das Prinzip dieses Experimentes ist, daß Lymphozyten in Kulturgefäßen mit spezifischen Antigenen stimuliert werden. Kommt es zur Aktivierung der Lymphozyten, da diese das Antigen

erkennen, setzen die aktivierte Lymphozyten Zytokine frei,
die ihrerseits an spezifische Antikörper binden, welche auf
der Bodenfläche der Kulturgefäße immobilisiert sind. Nach dem
Auswaschen der Lymphozyten können dann die gebundenen Zytokine
5 in den Kulturgefäßen mit Hilfe eines zweiten Antikörpers, der
in einer nachgeschalteten Farbreaktion sichtbar gemacht wird,
nachgewiesen werden.

Periphere Blutlymphozyten (PBL) werden von einem HLA-A0201
10 positiven gesunden Probanden durch Dichtezentrifugation über
einen Ficoll Paque®-Gradienten aufgereinigt. T-Lymphozyten
werden durch Abtrennung der B-Lymphozyten bzw. der Monozyten
mit Hilfe Antikörper gekoppelter Magnetobeads (CD11, CD16,
15 CD19, CD36 und CD56) (Pan T cell isolation Kit®, Milteny,
Bergisch Gladbach, Germany) gewonnen. Aus 30 ml Blut werden
etwa 2×10^7 T-Zellen gewonnen werden.

HLA-A0201 restringierte Peptide von p16 werden mittels eines
20 Softwaresystems des NIH (NIH bioinformation service
[http://bimas.dcrt.nih.gov.cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform)
identifiziert. Es handelt sich um die nachstehenden Peptide:

9mer Peptide:

score 1: VMMMGGSARV
25 score 2: VLHRAGARL
score 3: TLTRPVHDA
score 4: LLHGAEPMNC
score 5: SMEPSADML

10mer Peptide:

score 1: MMGSARVAEL
score 2: LLLHGAEPMNC
score 3: GVMMMGGSARV

30 Die isolierten T-Zellen werden mit T2-Zellen inkubiert, die
(a) mit einem Gemisch der vorstehenden 9mer Peptide
(10 μ g/Peptid) und (b) mit einem Gemisch der vorstehenden 10mer
Peptide (10 μ g/Peptid) beladen worden sind. Die T-Zellen werden
über 6-Wochen jeweils wöchentlich restimuliert. Jeweils 10^7 T-
35 Zellen werden mit 2×10^6 Peptid-beladenen T2-Zellen in 24
Lochplatten cokultiviert.

Die Reaktivität gegenüber den Peptid-beladenen T2-Zellen wird

wöchentlich bestimmt, beginnend am Tag 0 des Experiments, indem eine IFN- γ Elispotanalyse durchgeführt wird. Am Tag 28 wird eine Reaktivität durch das Gemisch von (a) (400 spezifische Zellen pro Million Zellen) beobachtet. Die 5 Hauptreaktivität ist dabei gegen das Peptid VMMMGGSARV (1000 spezifische Zellen / 1 000 000 Zellen) gerichtet (Fig. 1). Eine schwächere Aktivität wird gegen das Gemisch von (b) (150 spezifische Zellen / 1 000 000 Zellen) beobachtet. Hier zeigt 10 das Peptid MMGSARVAEL die höchste Reaktivität (600 spezifische Zellen / 1 000 000 Zellen).

Somit wird deutlich, daß gegen p16 aktivierte CD8 $^{+}$ -T Zellen stimuliert werden können.

15 **(B) Lyse von p16-überexprimierenden Carcinom-Zellen**

Nach einer weiteren Restimulierung werden die aktivierte CD8 $^{+}$ -T Zellen mit den HLA A0201+ Zervixkarzinomzellen Caski, die 20 p16 überexprimieren, inkubiert. Als Kontrollen werden die Kolonkarzinomzellen SW480 verwendet, die p16 nicht überexprimieren. 10⁶ Caski-Zellen werden mit ⁵¹Cr (100 μ Ci) für 25 1 h bei 37°C markiert und mit steigenden Zahlen an aktivierte CD8 $^{+}$ -T Zellen für 3 Stunden kokultiviert. Die spezifische Lyse der Caski-Zellen wird durch die Menge der freigesetzten Radioaktivität im Überstand bestimmt.

Es zeigt sich, daß Caski-Zellen durch die aktivierenden CD8 $^{+}$ -T Zellen, nicht aber die Kontrollzellen SW480 lysiert werden (Fig. 2).

Patentansprüche

5

1. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein Zellzyklus-Regulatorprotein und/oder eine exprimierbare, hierfür kodierende Nukleinsäure in einer für eine Immunisierung eines Individuums gegen Carcinome und ihre Vorstufen geeigneten Menge sowie üblich Hilfsstoffe.

10

2. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das Zellzyklus-Regulatorprotein ein Zyklin ist.

15

3. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das Zellzyklus-Regulatorprotein eine Zyklin-abhängige Kinase ist.

20

4. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 3, wobei die Zyklin-abhängige Kinase cdk4 oder cdk6 ist.

25

5. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das Zellzyklus-Regulatorprotein ein Zyklin-abhängiger Kinase-Inhibitor ist.

30

6. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 5, wobei der Zyklin-abhängige Kinase-Inhibitor ein Protein p15, p16, p18 oder p19 ist.

35

7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Zellzyklus-Regulatorprotein in Form eines oder mehrerer Fragmente vorliegt.

8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei das oder die Fragmente von cytotoxischen T-Zellen erkennbare und eine cytotoxische Immunantwort auslösende Epitope enthalten.

9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Carcinome solche des oberen Respirationstraktes sind.
- 5 10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Carcinome Anogenital-Carcinome sind.
11. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 10, wobei das Anogenital-Carcinom ein Cervix-Carcinom ist.
- 10 12. Verwendung eines Zellzyklus-Regulatorproteins und/oder einer exprimierbaren hierfür kodierenden Nukleinsäure zur Immunisierung eines Individuums gegen Carcinome und ihre Vorstufen.
- 15 13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei das Zellzyklus-Regulatorprotein ein Zyklin ist.
14. Verwendung nach Anspruch 12, wobei das Zellzyklus-Regulatorprotein eine Zyklin-abhängige Kinase ist.
- 20 15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei die Zyklin-abhängige Kinase cdk4 oder cdk6 ist.
- 25 16. Verwendung nach Anspruch 12, wobei das Zellzyklus-Regulatorprotein ein Zyklin-abhängiger Kinase-Inhibitor ist.
17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei der Zyklin-abhängige Kinase-Inhibitor ein Protein p15, p16, p18 oder p19 ist.
- 30 18. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 bis 17, wobei das Zellzyklus-Regulatorprotein in Form eines oder mehrerer Fragmente vorliegt.
- 35 19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei das oder die Fragmente von cytotoxischen T-Zellen erkennbare und eine cytotoxische Immunantwort auslösende Epitope enthalten.

20. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 bis 19, wobei die Carcinome solche des oberen Respirationstraktes sind.

5 21. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 bis 19, wobei die Carcinome Anogenital-Carcinome sind.

22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei das Anogenital-Carcinom ein Cervix-Carcinom ist.